

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 28 OCT 2003	
WIPO	PCT

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 46 965.2

Anmeldetag: 9. Oktober 2002

Anmelder/Inhaber: Merck Patent GmbH, Darmstadt/DE

Bezeichnung: Fischsilberanaloge Perlglanzpigmente, hergestellt durch enzymatische Umsetzung

IPC: C 09 B, C 12 P, C 07 D

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 14. Juli 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Agurks

**Merck Patent Gesellschaft
mit beschränkter Haftung
64271 Darmstadt**

**Fischsilberanaloge Perlglanzpigmente,
hergestellt durch enzymatische Umsetzung**

Fischsilberanaloge Perlglanzpigmente, hergestellt durch enzymatische Umsetzung

5 Die vorliegende Erfindung betrifft fischsilberanaloge Perlglanzpigmente, hergestellt durch enzymatische Umsetzung von Nucleosiden und/oder Nucleotiden, Verfahren zu deren Herstellung sowie die Verwendung der fischsilberanalogen Perlglanzpigmente.

10 Das erste Perlglanzpigment war das natürliche Fischsilber, das aus Fischschuppen gewonnen wird und aus den zwei Purinen Guanin (75-97%) und Hypoxanthin (3-25%) besteht. Als ergiebigste Rohstoffquellen sind die Schuppen von Hering, Ukelei und Sardine zu nennen. Die flächenartigen Pigmentkristalle werden aus wässrigen Dispersionen von Fischschuppen mit organischen Lösungsmitteln extrahiert. Dabei werden die Proteine
15 herausgelöst und die Kristalle von den Schuppen getrennt. Die Guanin- und Hypoxanthinkristalle werden durch Zentrifugieren isoliert. Zum Entfernen löslicher Proteine und Fischöle werden die plättchenförmigen Kristalle abschließend gewaschen.

20 Natürliches Fischsilber kristallisiert bevorzugt in Nadeln, länglichen oder auch sechseckigen Blättchen, die 1 bis 10 μm breit, 20 bis 50 μm lang und nur 25 bis 75 nm dick sind. Weiterhin treten pyramidenförmige Kristalle auf (Kantenlänge ca. 10-30 μm). Die optisch anisotropen Kristalle haben eine Brechzahl von ca. 1.8 und eine vergleichsweise niedrige Dichte von 1.6
25 g/cm^3 .

Da die Fischschuppen weniger als 1% des Pigments enthalten und zudem die Gewinnung sehr aufwendig ist, sind die Preise für natürliches Fischsilber vergleichsweise hoch. Weiterhin kommt es zum Auftreten von
30 Qualitätsschwankungen, die einen Einsatz des natürlichen Fischsilbers als Ausgangsstoff in der modernen Industrie unmöglich machen. Der relativ

hohe Anteil an Verunreinigungen führt bei der Lagerung zu einer Gelbfärbung und zur Entwicklung von Fischgeruch. Zusätzlich ist das Pigment im trockenen Zustand mechanisch sehr empfindlich und neigt zur Agglomeration. Es kommt daher nur in Form von Suspensionen mit meist 10 bis 12% Feststoffgehalt unter dem Namen „Perlessenz“ oder „Essence d'Orient“ in den Handel.

Die aufgrund der geringen Dichte erhaltene geringe Absetzneigung und der bereits bei Zusatz geringer Mengen auftretende seidige und perlenmäßige Glanz ist die Ursache dafür, dass sich Fischsilber trotz der oben genannten Nachteile bis heute in kosmetischen Formulierungen behaupten kann. Das Haupteinsatzgebiet sind Nagellacke wegen der geringen Sedimentationsneigung und da der dort verwendete Nitrocellulose-Lack den Fischgeruch überdeckt.

Es hat einige Versuche gegeben, Guanin bzw. andere stickstoffhaltige Heterocyclen in Form plättchenförmiger Kristalle abzuscheiden, um fischsilberanalogue Pigmente herzustellen. Die Steuerung der Kristallisation in Richtung plättchenförmiger Kristalle ist zwingend zur Erzielung eines Glanzeffektes erforderlich kann aber bislang nur schwer realisiert werden.

Die DE 1 242 778 beschreibt ein Verfahren zur Umwandlung von verdampfenden Substanzen wie z. B. Guanin in Plättchen mittels Vakuumsublimation. Dieses Verfahren ist sehr aufwendig und ist wegen der apparativen Anforderungen nur für die Darstellung geringer Mengen an Pigment geeignet.

Aus der DE 1930265 ist ein Verfahren zur Herstellung synthetischer perlmuttglänzender Pigmente bekannt, wobei Nucleinbasen, Nucleoside oder Nucleotide aus Lösung kristallisiert werden. Dabei wird 1/5 bis 3/4 der in der wässrigen Lösung vorhandenen Nucleinverbindung im Verlauf von 30 Minuten auskristallisiert, und die so erhaltenen Kristalle werden 1 bis 24

Stunden reifen gelassen. Die Steuerung der Kristallisation kann über mehrere Parameter wie pH-Wert, Temperatur oder Art der Lösungsmittel. Dieses Verfahren ist wegen dieser Vielzahl an Parametern nur schlecht zu reproduzieren. Zusätzlich ist die Löslichkeit der Nucleinverbindungen problematisch. So sind die Nucleinbasen aufgrund ihres amphoteren Charakters nur in starken Säuren oder Basen als entsprechende Salze löslich. Die Löslichkeit nimmt bei extremen pH-Werten (um pH 0 oder pH 14) stark zu und ist im Neutralbereich am geringsten (pH 4.5-8). Bei Auflösung der Kristalle durch pH-Wert-Änderung werden die jeweiligen Ionen wirksam, die auch in das Kristallgitter eingebaut werden. Die kristallisierten Salze reagieren bei Auflösung stark basisch oder sauer. Bei der Neutralisierung entstehen durch Entfernung der (Alkali)-Kationen oder Säureanionen aus dem Kristallgitter unregelmäßige Fällungen von „geschrumpfter Struktur“ ohne Oberflächenglanz.

Es bestand daher die Aufgabe, ein einfaches Verfahren zur Herstellung fischsilberanaloger Perlglanzpigmente mit einem mit dem natürlichen Fischsilber vergleichbaren Glanz und Aussehen zu finden, das die oben genannten Nachteile nicht aufweist.

Überraschenderweise wurde gefunden, dass das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von fischsilberanalogen Perlglanzpigmenten das eingangs geschilderte komplexe Anforderungsprofil erfüllt.

Gegenstand der Erfindung sind daher fischsilberanaloge Perlglanzpigmente, hergestellt durch enzymatische Umsetzung von Nucleosiden und/oder Nucleotiden unter Bildung der Nucleobasen in Form plättchenförmiger Kristalle sowie ein Verfahren zur Herstellung fischsilberanaloger Perlglanzpigmente, dadurch gekennzeichnet, dass Nucleoside und/oder Nucleotide in ein oder mehreren Schritten enzymatisch unter Bildung der Nucleobasen in Form plättchenförmiger Kristalle umgesetzt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren bietet einen einfachen Zugang zu fischsilberanalogen Pigmenten mit naturgleichem Glanz, guter Oberflächenglätte und hohem Brechungsindex. Durch Verwendung von Enzymen laufen die Reaktionen alle in der Nähe des Neutralpunktes ab, so dass keine störenden Kationen oder Anionen in das Kristallgitter eingebaut werden. Weiterhin führt die Verwendung enzymatischer Reaktionen zu einem gleichmäßigen Aufbau der plättchenförmigen Kristalle, die zu Pigmenten hoher Qualität und Einheitlichkeit führen.

Die im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzten Nucleoside oder Nucleotide können alle dem Fachmann bekannten Pyrimidin- und/oder Purinbasen sowie weitere heterocyclische Verbindungen dieses Typs enthalten, wie z.B. Guanin, Hypoxanthin, Adenin, Cytosin, Uracil, Thymin. Vorzugsweise werden Purinbasen-haltige Nucleoside bzw. Nucleotide verwendet, insbesondere aber Guanin- und Hypoxanthin-haltige Nucleoside bzw. Nucleotide.

Bei den im erfindungsgemäßen Verfahren einsetzbaren Enzymen handelt es sich um jene aus den Klassen der Hydrolasen und Transferasen (int. Enzymklassifikation 2.4, 3.1 und 3.2). Bevorzugt eingesetzt werden Naringinase, Hesperidinase, Nucleotidase, β -Amylase, Nucleosidase, Inosinase und NAD-ase, darüber hinaus Pentosyl-Transferasen, insbesondere Pyrophosphat-Phosphoribosyltransferasen und Purin-nucleosidphosphorylase sowie weitere dem Fachmann bekannte in ähnlicher Weise wirkende Enzyme allein oder in Form eines Gemisches. Die Enzyme können in beliebiger Form, vorzugsweise in wässriger Lösung, zugesetzt werden.

Bei der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die Nucleoside/Nucleotide unter Rühren in Wasser gelöst. Der pH-Wert der Lösung wird auf einen Bereich von 3.5 bis 8.0 eingestellt. Der bevorzugte

pH-Wert liegt im Bereich von 4.4 bis 7.0. Eine Optimierung des pH-Wertes der Reaktionsmischung kann in für den Fachmann naheliegender Weise erfolgen.

- 5 Die Einstellung des pH-Wertes der Lösung erfolgt durch Zugabe von Pufferlösungen. Als Pufferlösungen können alle dem Fachmann bekannten Puffer wie z.B. Acetat-, Citrat- oder Phosphatpuffer eingesetzt werden. Bevorzugt werden Citratpuffer, insbesondere Natriumcitratpuffer eingesetzt.
- 10 Die Temperatur der Lösung wird auf einen Bereich von 20 bis 75 °C eingestellt. Bevorzugte Temperaturbereiche liegen bei 30 bis 60 °C und können in für den Fachmann naheliegender Weise an den optimalen Arbeitsbereich der eingesetzten Enzyme angepasst werden.
- 15 Die in dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzten Enzyme werden der so hergestellten Nucleosid/Nucleotid-Lösung zugegeben. Bevorzugt erfolgt die Zugabe der Enzyme in Lösung, insbesondere in wässriger Lösung. In einer besonderen Ausführungsform kann die Enzymlösung mit üblichen Zusatzkonzentrationen der Konservierungsmittel stabilisiert werden. Es können alle gängigen Konservierungsmittel eingesetzt werden,
- 20 bevorzugt erfolgt die Konservierung mit Sorbinsäure.
- 25 Die Menge des eingesetzten Enzyms richtet sich nach der gewünschten Bildungsgeschwindigkeit der fischsilberanalogen Perlglanzpigmente unter Berücksichtigung der Umsatzzahl des eingesetzten Enzyms. Sie kann durch einfache Optimierung an die jeweiligen Bedürfnisse angepasst werden. In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Zugabe des Enzyms in mehreren Schritten bei abnehmender Zahl der Enzymeinheiten im Verlauf der Reaktion. Die Umsetzungsdauer beträgt zwischen 5 und 120 Stunden, bevorzugt 12 bis 72 und insbesondere 12 bis 36 Stunden.
- 30 Um eine verbesserte Kristallisation der fischsilberanalogen Perlglanzpigmente zu erreichen, kann bereits so hergestelltes oder auch

natürliches Fischsilber zur Animpfung der Reaktionslösung zugesetzt werden.

5. Weiterhin können in dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Steuerung der Oberflächen- und Kristallstruktur der fischsilberanalogen Perlglanzpigmente grenzflächenaktive Substanzen der Reaktionsmischung zugesetzt werden. Hierzu können alle dem Fachmann bekannten nichtionischen und/oder ionischen Tenside eingesetzt werden, wie sie z.B. in K. Lindner, Tenside, Textilhilfsmittel, Waschrohstoffe, Vol. I, Wissenschaftl. Verlags GmbH, Stuttgart 1964 beschrieben sind und u.a. von der Fa. ICI erhältlich sind. Bevorzugt eingesetzt werden Polyalkylenglycole und Polysorbate, wie z.B. Nonylphenolpolyglycolether und Sorbitanmonolaurate (ethoxyliert) oder auch höherkettige Alkylate, wie z.B. Myristate, Palmitate oder Stearate.

15

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens können gelbildende polymere Substanzen zur Unterstützung der flächenartigen Kristallausbildung und zur Erzeugung hoher Oberflächenglätte eingesetzt werden. Hierzu können alle dem Fachmann bekannten Gelbildner eingesetzt werden, wie z.B. Alginate, Gelatine und Gelatinederivate, Cellulose und Cellulosederivate, Polyosen oder Stärke und Stärkederivate. Bevorzugt eingesetzt werden Alginate, Gummi arabicum, Gelatine und Gelatinederivate und insbesondere Xanthan Gum.

20

25. Zusätzlich kann die Reaktionsmischung mit Farbstoffen versetzt werden, die zu einer Einfärbung der fischsilberanalogen Perlglanzpigmente führt. Als Farbstoffe eignen sich alle dem Fachmann bekannten organischen Pigmente wie z.B. natürliche oder synthetische Farbstoffe. Bevorzugt werden wasserlösliche, natürliche Pigmente eingesetzt, wie z.B. Karmin oder Chlorophyllin.

30

Die Isolierung der Kristalle kann nach allen dem Fachmann bekannten Verfahren erfolgen. Bevorzugt erfolgt eine Isolierung der Kristalle über einfaches oder mehrfaches Zentrifugieren der Reaktionsmischung und anschließendes Waschen der Kristalle, bevorzugt mit Wasser. Zur weiteren Verwendung können die fischsilberanalogen Perlglanzpigmente getrocknet werden.

Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhaltenen fischsilberanalogen Perlglanzpigmente zeigen gegenüber dem natürlichen Fischsilber einen vergleichbaren Glanz, bei gleichzeitiger verbesserter Zugänglichkeit. Die bei natürlichem Fischsilber auftretenden Nachteile wie Gelbstichigkeit oder Fischgeruch treten hier nicht auf. Weiterhin lassen sich die erfindungsgemäß hergestellten fischsilberanalogen Perlglanzpigmente in trockener Form einsetzen und anwenden, was neben der Verwendung in der für Fischsilber etablierten Kosmetik auch andere Anwendungsbereiche eröffnet, wie z.B. technische Anwendungen.

Gegenstand der Erfindung ist somit auch die Verwendung der erfindungsgemäßen fischsilberanalogen Perlglanzpigmente in der Kosmetik, in Lacken, Farben, Kunststoffen, Agrarfolien, zur Saatguteinfärbung, zur Lebensmitteleinfärbung oder in Arzneimittelüberzügen.

Die gute Einarbeitbarkeit der erfindungsgemäß hergestellten fischsilberanalogen Perlglanzpigmente führt zu einer universellen Einsetzbarkeit in Formulierungen für eine Vielzahl von Anwendungen.

Gegenstand der Erfindung sind demgemäß auch Formulierungen enthaltend fischsilberanaloge Perlglanzpigmente, hergestellt nach dem erfindungsgemäßen Verfahren.

Die nachfolgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern, ohne sie jedoch zu begrenzen.

Beispiele:Beispiel 1:

5 1.0 g Guanosinmonophosphat-Natriumsalz (E 627) und 0.25 g
Inosinmonophosphat-Natriumsalz (E 631) werden in 150 ml demin. Wasser
gelöst und mit 250 mg Magnesiumsulfat und 2.5 g tetra-Natriumdiphosphat
sowie 20 mg Nonylphenolpolyglycoether versetzt. Man impft mit wenig
Fischsilber an, z.B. 10 bis 20 mg, um die Kristallbildung zu beschleunigen.
10 Die leicht basische Lösung wird mit 10 %iger Citronensäure auf einen pH-
Wert von 7.2 eingestellt und das Volumen der Lösung auf 200 ml
aufgefüllt. Dann werden ca. 20 U Purinpyrophosphatphosphoribotrans-
ferase (2.4.2.8.), gelöst in wenig Wasser, zugegeben. Die Lösung wird auf
40°C erwärmt und in einer geschlossenen Apparatur langsam gerührt. In
den ersten 10 Stunden werden stündlich je 8 U des Enzyms kontinuierlich
15 zudosiert. In den weiteren 48 Stunden wird die Zudosierung stufenweise
auf 4 und später auf 2 U reduziert. Die Enzymlösung ist mit 0,05 %
Sorbinsäure konserviert.

Es entstehen hochglänzende, sehr dünne Kristallblättchen
unterschiedlicher Größe, größenordnungsmäßig im Bereich von 5-30 µm
20 Länge und 2-12 µm Breite. Die praktisch wasserunlöslichen feinen
Lamine werden abzentrifugiert, dreimal mit demin. Wasser gewaschen
und schonend getrocknet. (Anfallende Menge ca. 320mg).

Beispiel 2:

25 Wie Beispiel 1, unter Verwendung von Purinnucleosidphosphorylase
(2.4.2.1)

Beispiel 3:

7.5 g Guanosinmonophosphat-Na-Salz und 2.5 g Inosin/Guanosinmonophosphat-Na-Salz (Gemisch 1:1) werden in 750 ml demin. Wasser gelöst. Dazu werden 250 ml einer Na-Citrat-Pufferlösung mit einem pH-Wert von 4.4 gegeben (Konz. an Citrat ca. 6 %). Dazu kommen die in wenig Wasser aufgelösten Enzyme Naringinase (Menge/Aktivität ca. 100 U) und Hesperidinase (Menge/Aktivität ca. 200 U). Zum besseren Kristallwachstum werden ca. 200 mg Ribosid zugegeben. Die Lösung wird im geschlossenen Reaktionsgefäß bei 44°C für ca. 24 Stunden langsam gerührt. Nach Ablauf der ersten 15 Std. wird nochmals die halbe Menge (50 U und 100 U) der o.a. Enzyme zugegeben.

Es entstehen nadel- und laminatartige Kristalle mit hohem Perlglanzeffekt, die dreimal abzentrifugiert und mit demin. Wasser gewaschen werden. Sie sind schwerlöslich in Wasser und praktisch unlöslich in organischen Lösungsmitteln und können in dieser Form als Perlglanzpigmente eingesetzt werden.

Beispiel 4:

4 g Ribosid-Verbindungen aus Beispiel 3, berechnet auf die Trockenmasse, werden in 300 ml demin. Wasser dispergiert und mit 100 ml Citrat-Pufferlösung (ca. 6 % citrathaltig) auf einen pH-Wert von 6.4 eingestellt und unter langsamem Rühren auf 54°C erwärmt. Dazu kommen 0.02 % Sorbitanmonolaurat (ethoxyliert) und 0.1% Xanthan-Gum, berechnet auf die ca. 400 ml des Ansatzes. 150 U an β -Amylase (3.2.1.2.) werden als Startaktivität eingesetzt. In den folgenden 48-72 Stunden werden stündlich, anfangs 15, später 10, bzw. 5 U an Enzymaktivität eindosiert. Die Enzymlösung ist mit 0.05 % Sorbinsäure konserviert. Die Suspension wird mit ca. 40 mg feiner Fischsilberblättchen angeimpft.

Es entstehen rechteckige, hochglänzende und stark lichtbrechende Perlglanzpigmentplättchen von einer weit gefächerten flächenmäßigen

Ausdehnung, z.B. von 3-20 μm Breite bis 5-50 μm Länge. Die sehr dünnen, laminatartigen Plättchen, deren Massenausbeute über 50 % liegt, werden zentrifugiert, gewaschen und schonend getrocknet. Alternativ können sie im letzten Waschprozess z.B. mit Aceton versetzt werden, um das anhaftende Wasser zu entfernen, und dann direkt in z.B. Cellulosenitrat oder z.B. Rizinusöl zu überführen. Diese Formulierungen können direkt für Anwendungen z.B. in Nagellacken oder Lippenkosmetika eingesetzt werden.

Beispiel 5:

4 g der gewaschenen Ribosid-Verbindungen aus Beispiel 4 werden in 400 ml demin. Wasser dispergiert und mit 100 ml Citratpuffer-Lösung (ca. 6% Citronensäure enthaltend) auf einen pH-Wert von 5.4 eingestellt. Dazu werden anfangs ca. 100 U an Nucleosidase (3.2.2.1.) eindosiert. Danach erfolgt die weitere Zudosierung der Enzymaktivitäten sehr langsam aus einer konservierten, verdünnten Enzymlösung, wie in Beispiel 4. Innerhalb von ca. 72 Stunden wird die Dosierate von ca. 10 U auf 2 U/Stunde zurückgeregelt. Die Suspension wird mit ca. 40 mg Fischsilber angeimpft. Es entstehen hochglänzende, stark lichtbrechende Pigmentplättchen, die dem Fischsilber, gewonnen aus Hering oder Forelle sehr ähnlich sind. Es handelt sich überwiegend um längliche, am Ende abgerundete Lamine von 1-5 μm Breite und einer Länge 3 bis 12 μm . Sie können in Analogie zu Beispiel 4 isoliert und weiterverarbeitet werden.

Patentansprüche

1. Fischsilberanaloge Perlglanzpigmente, hergestellt durch enzymatische Umsetzung von Nucleosiden und/oder Nucleotiden unter Bildung der Nucleobasen in Form plättchenförmiger Kristalle.
2. Verfahren zur Herstellung fischsilberanaloger Perlglanzpigmente nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass Nucleoside und/oder Nucleotide in ein oder mehreren Schritten enzymatisch unter Bildung der Nucleobasen in Form plättchenförmiger Kristalle umgesetzt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Nucleosid und/oder Nucleotid ein Pyrimidin- und/oder Purinnucleosid/nucleotid ist.
4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Nucleosid und/oder Nucleotid Guanin oder Hypoxanthin enthält.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym eine Hydrolase oder Transferase ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym Naringinase, Hesperidinase, Nucleotidase, β -Amylase, Nucleosidase, Inosinase, NAD-ase Pyrophosphat-Phosphoribosyltransferase, Purinnucleosidphosphorylase oder ein Gemisch dieser ist.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym oder Enzymgemisch in mehreren Schritten mit abnehmenden Enzymeinheiten zudosiert wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich grenzflächenaktive Substanzen zugegeben werden.
- 5 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich gelbildende polymere Substanzen zugesetzt werden.
- 10 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich Farbstoffe zugesetzt werden.
11. Verwendung von fischsilberanalogen Perlglanzpigmenten gemäß Anspruch 1, in der Kosmetik, in Lacken, Farben, Kunststoffen, Agrarfolien, zur Saatguteinfärbung, zur Lebensmitteleinfärbung oder in Arzneimittelüberzügen.
- 15 12. Formulierungen enthaltend fischsilberanaloge Perlglanzpigmente, gemäß Anspruch 1.

20

25

30

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft fischsilberanaloge Perlglanzpigmente, hergestellt durch enzymatische Umsetzung von Nucleosiden und/oder Nucleotiden, Verfahren zu deren Herstellung sowie die Verwendung der fischsilberanalogen Perlglanzpigmente.

5

10

15

20

25

30